MagExtractor®-*MBP*-を用いたMBP融合タンパク質の精製

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　楠本 正博

はじめに

MagExtractor®-*MBP*-は、マルトース結合タンパク質（Maltose Binding Protein；MBP）がアミロースに結合することを利用した、MBP融合タンパク質のマニュアル用* 精製キットです。MBP融合用ベクターを用いて大腸菌などで発現させた目的タンパク質を簡便に精製することができます。

今回は、病原性大腸菌O157：H7のゲノムに最も多く（約20コピー）存在する挿入配列（Insertion Sequence；IS）であるIS*1203*v[1)]について、その転移酵素（IS*1203*v transposase）をMBP融合タンパク質として発現させ、精製した事例をご紹介します。

*本製品は自動核酸抽出装置MFX®シリーズには対応しておりません。磁性ビーズ分離用スタンドMagical Trapper（Code No. MGS-101）または簡易遠心機をご使用ください。市販の磁性ビーズ分離用スタンドもご使用いただけます。

方　法

1. 発現プラスミドの構築

MBP融合用ベクターpMAL-c2E（New England Biolabs社）を用いて、MBP融合transposase（MBP-TNP）の発現プラスミド（図1、融合型）を構築しました。また、発現量などを比較するため、前記プラスミドからMBP遺伝子のみを欠失させた発現プラスミド（図1、野生型）も構築しました。

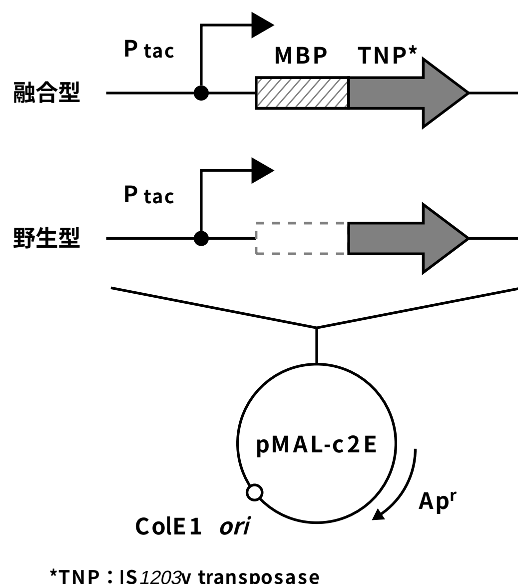


図1：発現プラスミドの構造

2. MBP融合型および野生型transposaseの発現

MBP融合型（MBP-TNP）および野生型transposase（TNP）の発現プラスミドで形質転換した大腸菌JM109をそれぞれ37℃で培養（OD_{660}=0.6～0.8）し、終濃度0.2mMのIPTGを添加後さらに30℃で4時間培養しました。そして培養液1mlを遠心分離して集菌し、MagExtractor®-*MBP*-に添付の吸着液1mlに懸濁後、超音波破砕を行いました。破砕液を遠心分離し、各タンパク質の発現量および溶解性をSDS-PAGEで確認しました。

3. MBP融合transposaseの精製

MagExtractor®-*MBP*-およびA社（非磁性）アミロースレジンを用いて、MBP-TNPを精製しました。なお、A社レジンは、MagExtractor®-*MBP*-の精製プロトコールと同量および5倍量を使用しました。MagExtractor®-*MBP*-による精製は以下のフローに、またA社レジンによる精製は製品の取扱説明書に従い、溶出液量はすべて100μlに統一しました。

菌体破砕液　（吸着液1ml中で超音波破砕）
↓
融合タンパク質の吸着　（磁性ビーズ懸濁液100μl添加）
↓　← *B/F 分離*
不純物の除去　（洗浄液1ml添加）
↓　← *B/F 分離*
融合タンパク質の溶出　（溶出液100μl添加）
↓　← *B/F 分離*
精製タンパク質

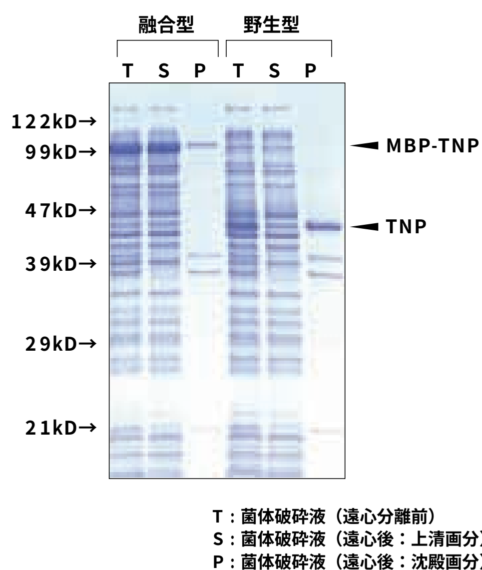
結果及び考察

図2に示す通り、発現した野生型transposase（TNP）の大半が沈殿（不溶性）画分に存在していますが、MBP融合型（MBP-TNP）では発現した目的タンパク質のほとんどが上清（可溶性）画分に存在しています。

また、遠心分離前の菌体破砕液を比較すると、MBPと融合させた方が目的タンパク質の発現量が多いことが判ります。したがって、IS*1203*v transposaseについては、MBP融合タンパク質として発現させることにより発現量、可溶性ともに向上しました。

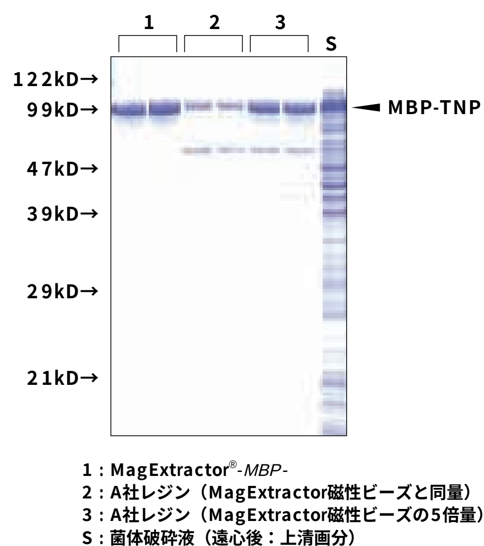
MagExtractor®-*MBP*-を用いてMBP融合transposase（MBP-TNP）を精製した結果、約10分間で図3のように純度の高い精製タンパク質を得ることができました。また、MagExtractor®-*MBP*-に添付の磁性ビーズは、同量のA社（非磁性）アミロースレジンと比較して約5倍以上の量のタンパク質を精製できることが示唆されました。

以上のように、MBPとの融合により可溶性IS*1203*v transposaseの発現量が大きく向上し、MagExtractor®-*MBP*-の使用により簡便な操作で高純度の精製タンパク質を得ることができました。



T：菌体破砕液（遠心分離前）
S：菌体破砕液（遠心後：上清画分）
P：菌体破砕液（遠心後：沈殿画分）

図2：MBP融合型および野生型transposaseの発現



1：MagExtractor®-*MBP*-
2：A社レジン（MagExtractor磁性ビーズと同量）
3：A社レジン（MagExtractor磁性ビーズの5倍量）
S：菌体破砕液（遠心後：上清画分）

図3：MBP融合型transposaseの精製

参考文献

1）Kusumoto, M., Nishiya, Y., Kawamura, Y., and Shinagawa, K., *J. Biosci. Bioeng.*, **87**: 93-96 （1999）

品 名 及 び 内 容	包　装	保存温度	Code No.	価　　格
MagExtractor® -*MBP*- ビーズ懸濁液 吸着液 洗浄液 溶出液 磁性ビーズ*	100回用	4℃	NPK-A01	\25,000

* 技術提携:日立マクセル株式会社

関連商品

品 名 及 び 内 容	包　装	保存温度	Code No.	価　　格
Magical Trapper	1個	室温	MGS-101	\38,000